

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHAMOTO, Ichio
Yuasa And Hara
New Ohtemachi Building, Section 206
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

16 octobre 2001 (16.10.01)

Applicant's or agent's file reference

YCT-460

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP00/01267

International filing date (day/month/year)

03 mars 2000 (03.03.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒

the applicant

☐

the inventor

☐

the agent

☐

the common representative

Name and Address

CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR
MOLECULAR MEDICINE, INC.
153-2, Nagai, Niihari-mura
Niihari-gun, Ibaraki 300-4101
Japan
(for all designated States except US)

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒

the person

☐

the name

☐

the address

☐

the nationality

☐

the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person in Box 1 has been deleted from the record as an applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒

the receiving Office

☐

the designated Offices concerned

☐

the International Searching Authority

☒

the elected Offices concerned

☐

the International Preliminary Examining Authority

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Shinji IGARASHI

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

15 March 2001 (15.03.01)

International application No.:

PCT/JP00/01267

Applicant's or agent's file reference:

YCT-460

International filing date:

03 March 2000 (03.03.00)

Priority date:

03 September 1999 (03.09.99)

Applicant:

MAYUMI, Tadanori et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

03 March 2000 (03.03.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT REQUEST

YCT-460

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	03.3.00
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Japan Patent Office (RO/JP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	YCT-460
I	Title of invention	METHOD AND FORMULATION FOR SUSTAINED INTRACELLULAR DRUG RELEASE
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.
II-5	Address:	153-2, Nagai, Niihari-mura, Niihari-gun, Ibaraki 300-4101 Japan
II-6	State of nationality	JP
II-7	State of residence	JP
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
III-1-5	Address:	5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan
III-1-6	State of nationality	JP
III-1-7	State of residence	JP

PCT REQUEST

YCT-460

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	MAYUMI, Tadanori
III-2-5	Address:	4-1-51-507, Shinryodai, Tarumi-ku, Kobe-shi, Hyogo 655-0041 Japan
III-2-6	State of nationality	JP
III-2-7	State of residence	JP
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	NAKAGAWA, Shinsaku
III-3-5	Address:	4-4-1-3-101, Nishikinomoto, Yao-shi, Osaka 581-0045 Japan
III-3-6	State of nationality	JP
III-3-7	State of residence	JP
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	TSUTSUMI, Yasuo
III-4-5	Address:	4-2-20-503, Aomataninishi, Minoo-shi, Osaka 562-0023 Japan
III-4-6	State of nationality	JP
III-4-7	State of residence	JP
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is:	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	NAKANISHI, Mahito
III-5-5	Address:	6-8-301, Yamada, Suita-shi, Osaka 565-0872 Japan
III-5-6	State of nationality	JP
III-5-7	State of residence	JP

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio
IV-1-2	Address:	YUASA and HARA Section 206, New Ohtemachi Bldg., 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004 Japan
IV-1-3	Telephone No.	03-3270-6641
IV-1-4	Facsimile No.	03-3246-0233
IV-1-5	e-mail	yulawpat@yuasa-hara.co.jp
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	IMAI, Shosuke; MASUI, Chuji; KURITA, Tadahiko; KOBAYASHI, Yasushi
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	--
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	CA JP US
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	03 September 1999 (03.09.1999)
VI-1-2	Number	249845/1999
VI-1-3	Country	JP
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	Japan Patent Office (JPO) (ISA/JP)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	-
IX-2	Description	18	-
IX-3	Claims	1	-
IX-4	Abstract	1	-
IX-5	Drawings	2	-
IX-7	TOTAL	27	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	Japanese	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	SHAMOTO, Ichio (seal)	
X-2	Signature of applicant, agent or common representative		
X-2-1	Name (LAST, First)	IMAI, Shosuke (seal)	
X-3	Signature of applicant, agent or common representative		
X-3-1	Name (LAST, First)	MASUI, Chuji (seal)	
X-4	Signature of applicant, agent or common representative		
X-4-1	Name (LAST, First)	KURITA, Tadahiko (seal)	
X-5	Signature of applicant, agent or common representative		
X-5-1	Name (LAST, First)	KOBAYASHI, Yasushi (seal)	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/JP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-460	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01267	国際出願日 (日.月.年) 03.03.00	優先日 (日.月.年) 03.09.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
治療による人体の処置方法に関するものである。
(PCT 第17条(2)(a)(i)、PCT 規則39.1(iv))
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K9/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K9/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	British Journal of Cancer, vol.73 (1996), H Mizuguchi et al. "Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer thrapy" p.472-476	1-5
A	J P, 11-116499, A (旭化成工業株式会社) 27. 4月. 1999 (27. 04. 99) (ファミリーなし)	1-5
A	J P, 9-110678, A (田辺製薬株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 05. 00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子

4 C

8517

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

10/070252

**COURTESY COPY OF THE
PCT APPLICATION AS
ORIGINALLY FILED WITH
IN JAPANESE**

明細書

2/10

細胞内薬物徐放化方法及び製剤

5 (技術分野)

本発明は、薬物、蛋白、遺伝子等の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための技術に関する。さらに詳細には、目的の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための生理活性物質含有組成物及び方法に関する。

10 (背景技術)

近年、遺伝子治療や新規ワクチン療法などを行うために、遺伝子や抗原性蛋白質などの生体高分子物質を細胞質内に直接、効率良く導入する開発が進められている。特に、遺伝子、抗原性蛋白質、生理活性蛋白質等の高分子物質は、低分子の薬物と異なり、膜透過性が悪く、吸収や組織移行性に乏しい上、血中で速やかに分解されてしまう。このような高分子生理活性物質を細胞に傷害を与えることなく自由に効率良く細胞質内に導入する技術の開発が望まれていた。

リポソームは多くの物質を保持することができ、しかも生体適合性であるため、生物活性物質運搬のためのキャリアーとして従来から注目されている。しかしながら、リポソームでは、細胞内への目的物質の導入効率が非常に悪く、ほとんど細胞質内へ導入されない。そのため、リポソーム表面をレクチン、抗体等で修飾して積極的に細胞表面に結合させる方法等、種々の工夫がなされてきた。しかしながら、リポソーム及び表面修飾リポソームは、いずれもエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるため、ライソゾーム酵素によって分解されてしまい、目的導入物質が実際に細胞質内に移行する割合が著しく低レベルになってしまうという欠点があった。

このような欠点を克服するため、エンドサイトーシス経路によらず、細胞の細胞膜を通過して細胞質に直接導入できるキャリアーとして、リポソームにセンダイウィルスの膜融合能を付与した膜融合リポソームが開発されたことが報告されている。この膜融合リポソームは、細胞膜への融合を仲介するセンダイウィルス

外被蛋白質とリボソームとの複合体を形成させることによって作製される。この膜融合リボソームは、センダイウィルスとほぼ同等の膜融合活性を有し、遺伝子、蛋白質等の高分子物質を内封することにより、細胞に傷害を与えることなく、効率良く目的物質を細胞質中に直接導入できると報告されている（日本DDS学会

- 5 誌「DDS」、Vol. 13, No. 1（1998年1月）第21～26頁、同誌第27～33頁）。

このような膜融合リボソームをキャリアーとする方法においても、細胞内での生理活性物質の放出を制御できないため、導入された物質が一時に放出され、その活性（毒性）が持続しないという欠点があった。例えば、細胞質内に遺伝子を

10 導入する場合、細胞質内での遺伝子の分解により発現が持続しない。また、薬理活性を有する蛋白質の場合、その活性が持続せず、投与回数及び投与量を増加させることが必要になる。したがって、生理活性物質を細胞内に直接に効率良く導入し、しかも細胞質内でこれらの物質の放出を制御することにより、細胞内での生理活性を効率的に発揮することが可能になる。このような細胞内導入用でかつ、

- 15 細胞内で目的導入物質を徐放化できる運搬キャリアーの開発が望まれている。

生理活性物質、特に蛋白質や遺伝子のような高分子物質を効率良く、しかも細胞膜を損傷することなく細胞内に導入でき、しかも細胞内において目的物質の放出プロファイルを制御、調節できる、安全かつ安定な運搬キャリアーを開発が望まれている。

- 20 （発明の開示）

本発明者等は、薬物の徐放化技術の一環として開発されている、ナノスフェアー（nanosphere）に着目し、このナノスフェアーと膜融合リボソームとを組み合わせることを見出して本発明を完成した。

従来より、生体内における薬物の徐放化を目指した研究が盛んに行われており、

- 25 多くの技術が提案されている。その1つとして、ナノスフェアーの技術がある。ナノスフェアーは高分子マトリックス等からなり、その内部に多量の薬物又は高分子量の物質を封入できる微粒子である。ナノスフェアー中に封入された薬物の放出速度は、そのナノスフェアー微粒子の大きさ、マトリックス構成高分子の種類、及び高分子の分子内または分子間の架橋度等を適宜選択することにより制御

可能である。しかしながら、ナノスフェアは、単独では細胞内に取り込まれにくく、取り込まれたとしてもエンドサイトーシス経路によるため、ライソゾーム酵素による分解を受けるため、導入効率が極端に悪くなるという欠点がある。

本発明者等は、目的生理活性物質封入ナノスフェアを膜融合リボソームと組み合わせて用いることが出来れば、細胞質内へのナノスフェアが効率良く導入でき、しかもナノスフェア内に封入された目的物質の細胞質内での放出が制御できるのでないかと考え、研究を重ねて本発明を完成した。

本発明は、薬物、蛋白質、遺伝子等の生理活性物質を封入したナノスフェアを、センダイウィルスの膜融合能を付与したリボソームに封入することを特徴としており、細胞内へ生理活性物質を直接かつ効率良く導入し、しかも細胞質内で徐放するための方法及びそのための組成物を提供するものである。

(図面の簡単な説明)

図1は、実施例2で作製したFITC-デキストランを封入したポリ(乳酸)ナノスフェアのFITC-デキストランの経時的放出を示すグラフである。

15 図2は、実施例3で作製したT7プロモーター配列を有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアの、ラット肝ホモジェナイザー分画との反応におけるプラスミドDNAの安定性を示すアガロースゲル電気泳動図である。

図3は、実施例3のゼラチンナノスフェアにおける、ゼラチンの架橋度と封入プラスミドDNAの放出量との関係を示すグラフである。

20 図4は、T4プロモーターを有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアを、更に封入した本発明の膜融合リボソームの、細胞内における同プラスミドDNAの経時的発現を示すグラフである。

(発明の実施の態様)

本発明で利用できるナノスフェアは、本発明の目的に沿ったものであれば、
25 従来知られた如何なる材料及び方法を用いて作成されたものでも良い。例えば、

Leelarasamee N. et al, J. Microencapsul. 5; 147-57, 1988, Singh M. et al, Pharm. Res. 12; 1796-1800, 1995, Rutledge L.C. et al, J. Am. Mosq. Do
ntrol. Assoc. 12; 39-44, 1996, Li J. K. et al, J. Pharm. Sci. 86; 891-895,
1997, Kofler N. et al, Int. Arch. Allergy. Immunol. 113; 424-432,

1997 等を参照されたい。本発明に使用できるナノスフェアは10 nm～1000 nm、好ましくは20～600 nmの粒径を有するものである。

本発明によれば、目的の生理活性物質を公知の方法でナノスフェア内に封入し、このナノスフェアを更に膜融合リポソーム中に封入した細胞内導入用、細胞質内徐放性組成物を作成する。リポソームはナノスフェアを保持できるものであれば特に限定されることなく用いられ、常法により、例えば逆相蒸発法 (Szoka, F., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 601 559 (1980))、エーテル注入法 (Deamer, D.W., Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 308 250 (1978))、界面活性剤法 (Brunner, J., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 455 322 (1976)) 等が用いられる。

リポソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類、チッソ脂質等の慣用の脂質を用いることができ、一般的にはリン脂質が好適である。リン脂質としては、各種天然リン脂質及びこれらの水素添加物、及び合成リン脂質が挙げられる。これらを単独又は2種以上の混合物として使用することもできる。さらに、一般に、リポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール、ステアシルアミン、アルファートコフェロール等を、リポソーム形成時に添加することもできる。

リポソームは、その構造が巨大な一枚膜リポソーム (GUV)、大きな一枚膜リポソーム (LUV)、多重層リポソーム (MLV)、小さな一枚膜リポソーム (SUV) のいずれであっても良い。その大きさも、GUVでは、1000 nm以上、LUVでは100 nm～1000 nm、MLVでは200～5000 nm、SUVでは100 nm以下の粒径である。本発明の目的には、10 nm～10 μm程度、更に好ましくは10～1000 nmの粒径が好ましい。

適当な脂質又は混合脂質等のリポソーム形成物質とリポソーム形成用添加剤としてのコレステロール等と共に、テトラヒドロフラン、クロロホルム、エタノール等のような有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて、減圧下に溶媒を留去して容器内面にリポソーム形成物質の膜を得る。例えば、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁に脂質のフィルムを作製する。これにナノスフェア溶液を内水相として添加し、混合する。さらにこのリポソーム溶液をセンダイウ

ィルス、不活性化センダイウィルス、センダイウィルスより精製された膜融合促進蛋白質等の膜融合促進物質と反応させ、膜融合リポソームを作製する。センダイウィルスは元々ヒトに対して病原性を持たないが、更にUV照射することにより、ウィルスRNAを断片化することによって安全性を高めることが好ましい。

- 5 また、本発明の膜融合リポソームは、センダイウィルスの膜融合能のみをリポソームに付与するものであり、安全な粒子である。本発明の膜融合リポソームは、例えばバンハム等の方法 (Bangham A. D. J. Mol. Biol. 13; 238-252, 1965) により作成できる。

- 10 本発明の膜融合リポソームに封入できる生理活性物質とは、細胞内に導入されて生理作用を生じる各種薬物；ホルモン、リンホカイン、酵素などの生理活性蛋白質；ワクチンとして作用する抗原性蛋白質；細胞内で発現する遺伝子、プラスミド等の遺伝子、又は発現を誘発又は誘導する特定の遺伝子の発現に関与する遺伝子；さらに遺伝子治療のために導入される各種遺伝子及びアンチセンス等を挙げることができる。本発明の技術は蛋白質、遺伝子などの高分子量生理活性物質
15 に適用するのに適しているが、低分子量の各種薬物に適用して好ましい結果を得ることができる。

- 本発明の膜融合リポソームは、前述のように安全であるばかりでなく、安定性も高く取り扱いも容易である。また、本発明の方法によれば、細胞質内への物質導入のバリアーである細胞膜の機能傷害を引き起こすことなく、効率良く目的物質
20 を細胞質内に導入できる。さらに、導入される活性物質は、ナノスフェアの特性、例えば、作製材料、粒子サイズ、架橋度等を適宜選択することにより、その細胞質内での放出プロファイルを制御でき、例えば徐放性にするという、本発明の目的を達成できる。さらに、本発明の膜融合リポソームを生存している細胞に接触させることにより、動物に生理活性物質を導入することができる。
- 25 本発明を以下に示す参考例及び実施例によって更に詳細に説明する。

[参考例] 膜融合リポソームによるナノスフェアの細胞内への導入

実験材料

L- α -ジミリスチル ホスファチジン酸 (PA)、卵黄ホスファチジルコリン (PC)、クロロホルムは日本油脂 (株) のものを用いた。コレステロール、蔗糖

糖、P-フェニレンジアミン、カルシウムイオノホアは和光純薬のものを用いた。フルオスフェア、カルボキシ修飾0.02 μ m黄緑色フルオロエセントとフルオスフェア（カルボキシ修飾0.02 μ m赤色フルオロエセント）（ナノスフェア）、カルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体はMolecular Probes, Inc. のものを用いた。イーグルMEMはニッスイのものを用いた。

実験方法

<リボソーム、膜融合リボソームの作製及び精製>

リボソームは、前掲のBanghamらの方法を一部変更して作製した。混合脂質（12.72 mg）[PA:PC:Chol=1:4:5（モル比）]をクロロホルムに懸濁し、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁にリピッドフィルムを作製した。これに内水相としてナノスフェア/BBS（-）液300 μ lを加えボルテックスミキサーにより、リボソームを作製した。このリボソーム溶液をセンダイウイルスと37℃にて2時間振盪させることにより反応させ、膜融合リボソームを作製した。膜融合リボソームの精製は、反応液を6%、20%、30%、40%、50%の蔗糖密度勾配の上に重層し、24000 rpm、4℃、2時間（SW28.1, Beckman）遠心操作により行なった。遠心後、20-30%、30-40%蔗糖溶液の界面に存在する膜融合リボソーム分画を回収しBBS（-）にて洗浄した[20000 rpm、4℃、40分間（SW28.1, Beckman）]。なお、膜融合リボソームはセンダイウイルスのRNAを断片化するため紫外線照射（2000 J/m²）した後、実験に使用した。

<リボソーム、膜融合リボソームのR18による標識>

0.1 mMのR18/エタノール溶液を蛍光量150000（Ex: 490 nm, Em: 515 nm）にそろえたりボソーム又は膜融合リボソーム溶液に1/100量加え、1時間室温で反応させた。未反応のR18は、25000 rpm、4℃、40分間（SW55, Beckman）の遠心により徐去した。

<培養細胞>

マウス繊維芽細胞Ltk⁻細胞は10%牛胎児血清（FCS）を含むイーグルMEM培地で培養した。

＜培養細胞へのナノスフェアーの導入＞

4 × 10⁴個のL tk⁻細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS (-) で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸濁したナノスフェアー、リボソーム、膜融合リボソーム（蛍光強度100000, Ex: 490 nm, Em: 515 nm）を1分間作用させた。PBS (-) で洗浄後、退色防止剤である0.1% p-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地を加えた。

＜共焦点レーザー顕微鏡での観察＞

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡はMRC-1024 (BIO-RAD) を用いた。Kr/Arlaserにより励起し、ナノスフェアー（黄緑色フルオロエセント）はEx: 488 nm, Em: 540 nm (540DF)、R18はEx: 568 nm, Em: 585 nm (585LP) で観察した。

＜Ca²⁺インディケーターを用いた細胞内導入効率の測定＞

ナノスフェアー（赤色フルオロエセント）に蛍光Ca²⁺インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を20 mMになるように混合し、1時間室温で混合することによりナノスフェアーに吸着させた。作用後、吸着していないカルシウムグリーン-1を透析（Spectra/Por Membranes MWCO: 12-14000）により徐去した後、バッファー置換してリボソーム及び膜融合リボソームを作製した。1日前に6穴プレートに播種した2 × 10⁴個のL tk⁻細胞をPBS (-) で洗浄し、蛍光強度2700 (Ex: 488 nm, Em: 534 nm) でそろえたカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体単独、カルシウムグリーン-1吸着ナノスフェアー、リボソーム、膜融合リボソームを1分間作用させた。作用後、PBS (-) で洗浄し、イーグルMEM培地で1時間培養後、トリプシンで細胞をはがし、蛍光強度を測定した (Ex: 488 nm, Em: 534 nm)。その後、カルシウムイオノホア/DM SO溶液を0.1 mg/mlになるように添加し、Ex: 488 nm, Em: 534 nmで測定した。

実験結果と考察

最初に蛍光ラベル化された直径20 nmのナノスフェアーを用いて、このナノスフェアーがリボソームや膜融合リボソームに封入され得るかどうかを共焦点レ

レーザー顕微鏡を用いて倍率10000倍で検討した。その結果、凝集している像ではあるが、直径20nmのナノスフェアの蛍光は、透過像写真によりリボソームや膜融合リボソームの観察される位置にのみ認められた。このことからナノスフェアはリボソーム内に封入可能であり、そのリボソームを用いてナノスフェア封入膜融合リボソームをも作製できることが明らかとなった。また、リボソーム又は膜融合リボソームに数個のナノスフェアが封入されていることが確認された。次に、作製したナノスフェア封入膜融合リボソームおよびリボソームをR18で膜標識した後、それぞれの細胞内へのナノスフェア導入能をLtk⁻細胞を用いて検討した。ナノスフェア封入リボソームやナノスフェアのみを単独で作用させた細胞ではほとんど蛍光が認められなかったのに対し、膜融合リボソームを作用させた細胞では細胞内に多量のナノスフェアが導入されているのが観察された。また、膜融合リボソームの膜標識に用いたR18の赤色蛍光の分布はナノスフェアとは異なり細胞内には認められず、細胞膜上にのみ観察された。また、膜融合リボソームを作用させたLtk⁻細胞を細胞の接着面から4μmごとにずらした断層像を観察したところ、細胞の形に合わせて細胞膜の内側にナノスフェアが確かに存在し、R18の蛍光が細胞膜上にあることが確認できた。

膜融合リボソームの膜融合能が再確認されたと共に、懸濁状態であるナノスフェアをも膜融合リボソームは効率良く細胞質内に導入できることが示唆されたので、次に、本現象をCa²⁺インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を用いてさらに詳細に検討した。カルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体はそれ自身は蛍光を有しないが、細胞内で内因性のエステラーゼにより加水分解され、Ca²⁺とキレートを形成することで初めて強い蛍光を発する。そこで、この性質を利用し、まずカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を表面に吸着させたナノスフェアを作製し、これを封入した膜融合リボソームを用いて細胞質内への導入を検討した。細胞質内にはほとんどカルシウムが存在しない条件下ではどの群においても蛍光はほとんど認められなかった。また、カルシウムイオノホア作用により細胞内カルシウム濃度を上昇させても、ナノスフェア単独やナノスフェア封入リボソームを作用させた細胞では蛍光

は認められなかった。さらに受動的に細胞質内に輸送されるカルシウムグリーン-1 アセトキシメチル誘導体自身を作用させた細胞ではわずかに蛍光が認められた程度であった。しかし、ナノスフェア-封入膜融合リボソームを作用させた細胞ではカルシウムグリーン-1 アセトキシメチル誘導体自身を作用させた細胞の
5 20倍以上もの強い蛍光が認められ、膜融合リボソームを用いることによりナノスフェアを効率よく積極的に細胞質内へ導入できることが判明した。

以上の結果より、膜融合リボソームを用いることにより直径20 nmのナノスフェアは細胞質内へ直接導入され、その導入効率が非常に高いことが判明した。また、膜融合リボソームを用いることにより、分子だけでなく粒子までも細胞質
10 内に導入できることが判明したことから、細胞内での物質の空間的動態制御はも

〔実施例1〕 膜融合リボソームによるローダミン-PE封入ポリウレア
ナノスフェア-及びFITC-デキストシン封入ポリ（乳酸）
ナノスフェア-の細胞質内導入

参考例において、膜融合リボソームを用いることにより粒子である直径20 n
15 mのナノスフェアも効率よく細胞質内への導入可能であることが判明した。そこで次に、薬物徐放化能を持つナノスフェアを作製し、細胞質内への導入及びナノスフェアの細胞内での安定性を検討した。将来の細胞質内における薬物徐放化可能なナノスフェアモデルとして、脂溶性薬物モデルとしてローダミン-PEを封入したポリウレアナノスフェア、水溶液薬物モデルとしてFITC-
20 Dextranを封入したポリ（乳酸）ナノスフェア（PLAナノスフェア-）を作製した。

この2種類のナノスフェアを封入した膜融合リボソームを作製し、細胞に作用させた後、ナノスフェアが細胞内で安定に存在しているかを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

25

実験材料

ジアシル ホスファチジルエタノールアミン-N-リサミン ローダミン B
スルフォニル（ローダミン-PE）はAvanti Polar Lipids, Inc. のものを用いた。ポリビニルアルコール（PVA）、ドリーレンジイソシアネート（TDI）、大豆油、ポリ（乳酸）（分子量5000；PLA）、スパン8

0、塩化メチレンは和光純薬のものを用いた。FITC-デキストラン（分子量150000）はシグマのものを用いた。その他の試薬は前節の「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

5 <ローダミン-PE封入ポリウレアナノスフェア（Ph-ポリウレアナノスフェア）の作製>

Ph-ポリウレアナノスフェアは界面重合法により作製した。すなわち、0.5% PVA/H₂O 20 ml を20000 rpmでホモジナイズし、TDI 2.4 g、大豆油2.5 gとローダミン-PE 0.5 mg/500 mlの混合物を、ゆ
10 っくりと加え、3分間ホモジナイズすることで水中油（O/W）型エマルジョンを作製した。0.5% PVA/H₂O 100 ml を10000 rpmでホモジナイズしておき、先程ホモジナイズしておいた混合物をゆっくり加え、さらに10分間ホモジナイズすることで水中水中油（（O/W）/W）型エマルジョンを作製した。さらに、ナノスフェア表面を強化するため0.5% PVA/H₂O 100 m
15 lを加え20分間、その後7000 rpm、2時間ホモジナイズをすることによりRh-ポリウレアナノスフェアを作製した。ナノスフェアの精製は10%、20%、30%、40%、50%ステップ蔗糖密度勾配上にポリウレアナノスフェアを重層し、24000 rpmで2時間（SW28.1、Beckman）の遠心操作により行なった。30-40%の蔗糖溶液の境界面に存在するRh-
20 ポリウレアナノスフェア分画を回収し、実験に使用した。

<FITC-デキストラン封入PLAナノスフェア（FITC-PLAナノスフェア）の作製>

FITC-PLAナノスフェアは界面沈殿法により作製した。すなわち、PLAの1 gとSpan 80の1 mlをCH₂Cl₂ 30 mlに加え10000 rpm
25 でホモジナイズし、FITC-デキストラン100 mg/mlを5 mlゆっくりと加え1分間ホモジナイズして油中水（W/O）型エマルジョンを作製し、0.5% PVA/H₂O 100 mlにゆっくり加えさらに5分間ホモジナイズすることで水中油中水（（W/O）/W）型エマルジョンを作製した。さらに7000 rpm、1時間ホモジナイズすることによりFITC-PLAナノスフェアを作製

し、上記条件下でステップ蔗糖密度勾配遠心により精製した。0-10%と10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在するFITC-PLAナノスフェア分画を回収し、実験に使用した。

<膜融合リボソームの作製及び精製>

- 5 参考例の「実験方法」の「リボソームと膜融合リボソームの作製及び精製」を改変して作製した。すなわち、Rh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リボソームの作製において、ナノスフェアの蛍光強度を50000 (Ex: 550 nm, Em: 590 nm) にしてBanghamらの方法によりリボソームを作製した。その後10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上にリボ
- 10 ソーム溶液を重層し、24000 rpmで2時間 (SW28. 1, Beckman) 遠心し、20-30%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収し、リボソームを精製した。これをセンダイウイルスと反応させ、その後反応物を20%、30%、35%、45%、50%蔗糖密度勾配上に重層し、24000 rpmで2時間 (SW28. 1, Beckman) 遠心し、30-35%及び35-40
- 15 %蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収することによりRh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リボソームを精製した。

- また、FITC-PLAナノスフェア封入膜融合リボソームの作製において、ナノスフェアの蛍光強度を10000 (Ex: 490 nm, Em: 520 nm) にしてリボソームを作製し、これをセンダイウイルスと反応させた。その後
- 20 10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上に反応物を重層し、24000 rpmで2時間 (SW28. 1, Beckman) 遠心した。0-10%、10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画から回収したナノスフェアから作製した膜融合リボソームはそれぞれ10-20%、20-30%の蔗糖溶液の境界面に存在し、この分画を回収することによりFITC-PLAナノス
- 25 フェア封入膜融合リボソームを作製した。

<培養細胞へのナノスフェアの導入>

4×10⁴個のLtk⁻細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS (-) で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸懸したRh-ポリウレアナノスフェアとRh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リボソーム

(蛍光強度10000, Ex: 550 nm, Em: 590 nm)、FITC-PLAナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア封入膜融合リポソーム(蛍光強度700, Ex: 490 nm, Em: 520 nm)を1時間作用させた。PBS(-)で洗浄後、イーグルMEM培地で培養した。1日後、退色防止剤である0.1%P-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地で置換し、観察した。

<共焦点レーザー顕微鏡での観察>

参考例の「実験方法」の「共焦点レーザー顕微鏡での観察」に準じて行なった。ローダミン-PEはEx: 568 nm, Em: 585 nm (585 LP)、FITC-デキストランはEx: 488 nm, Em: 540 nm (540 DF)で観察した。

作製したR-ポリウレアナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア及びそれぞれのナノスフェア封入膜融合リポソームを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、それぞれのナノスフェアが確かに作製されたことが判明した。

また、透過像写真において膜融合リポソームが観察される位置にそれぞれのナノスフェアに封入された物質の蛍光が存在することから、ポリウレアナノスフェア、PLAナノスフェアは膜融合リポソームに封入可能であることが観察された。この実施例で作製したナノスフェアは透過像写真により、ポリウレアナノスフェアの場合、粒子径は200 nm前後、PLAナノスフェアでは約500 nmであることが判明した。また、それぞれのナノスフェアは膜融合リポソームに封入されており、膜融合リポソームのサイズに対し比較的大きな粒子であるナノスフェアでも膜融合リポソームに封入可能であることが判明した。さらに、ポリウレアナノスフェアが膜融合リポソームに封入できたことより、これまでのリポソーム作製法では封入効率が低かった疎水性の薬物をも大量に封入した膜融合リポソームを作製できることが判明した。また、これらのナノスフェア封入膜融合リポソームをLtk⁻細胞に作用させて1日後に観察したところ、これらのナノスフェアは細胞内に確かに存在することが観察された。また、膜融合リポソームによりナノスフェアを導入したLtk⁻細胞は1日後においても形態変化は観察されず、表面的な細胞傷害性はないことが判明した。

このことより、膜融合リポソームは100から500 nmのナノスフェアで

も細胞質内に導入可能であり、さらにこれらのナノスフェアーは1日後においても細胞質内に安定に存在することが確認できた。そこで実施例2では、作製したナノスフェアーからの薬物の放出について検討した。

〔実施例2〕FITC-デキストラン封入ポリ（乳酸）ナノスフェアーの

5 徐放化能

実施例1において、作製したナノスフェアーが膜融合リポソームにより細胞質内へ導入可能であり、かつ少なくとも24時間は細胞内で安定に存在することが判明したが、これらのナノスフェアーが薬物放出かつ徐放が出来なければ当然のことながら細胞内における薬物徐放化は望めない。そこで、FITC-デキストランをモデル薬物と見立て、作製したFITC-PLAナノスフェアーからの徐放を検討した。

実験材料

試薬は実施例1の「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

15 <FITC-デキストラン封入PLAナノスフェアーからの薬物徐放の評価>

FITC-PLAナノスフェアーを蛍光強度100000（Ex：490nm，Em：520nm）でBSS（-）に懸濁し、37℃条件下でインキュベートした。0、1、2、3、4日後、10000rpmで遠心してナノスフェアーを除き、上清のFITC-デキストランの量をEx：490nm，Em：520nm
20 で蛍光光度計を用いて測定した。

実験結果と考察

実施例1で用いたFITC-PLAナノスフェアーからのFITC-デキストランの放出を検討したところ、図1に示したように、4日後においてもわずか6%程度の放出率であり、ゆっくりと徐放されていることが判明した。PLAナノ
25 スフェアー又はマイクロスフェアーの薬物放出は3週間から3カ月程度と言われており、3日後の放出率が10数%という報告もあるが、この実施例で作製したPLAナノスフェアーはこれまでの報告に比べると放出がやや遅い。しかし、PLAナノスフェアーからの薬物放出速度は、PLAの分子量や球体サイズを調節することにより制御が可能であることから、ナノスフェアーの作製条件を適宜変

更することにより細胞質内での薬物徐放特性を調節できる。

実施例 1 の結果とこの実施例 2 の結果を考え合わせるにより、細胞質内においてナノスフェアからの薬物の徐放化が達成された。

〔実施例 3〕ゼラチンナノスフェアに封入されたプラスミド DNA の

5 安定化及び徐放化に関する検討

T 7 発現系はバクテリオファージの T 7 RNA ポリメラーゼと T 7 プロモーター配列を有するプラスミド DNA とを同時に細胞質内に存在させることにより効率よい遺伝子発現が可能となるものである。しかしながら、細胞質内におけるプラスミド DNA の安定性が乏しいため、遺伝子が速やかに分解され消失してしま
10 い、遺伝子発現期間が非常に短い。したがって、T 7 発現系により、疾病治療に必要な期間、必要な量の遺伝子発現を行わせるためには、細胞質におけるプラスミド DNA の安定化および徐放化といった細胞質内での遺伝子の動態制御が必要となってくる。その点、ナノスフェアは徐放化製剤として用いられており、さらに参考例、実施例 1、2 において細胞質内へ導入及び徐放化が可能であること
15 が判明している。ナノスフェアの材質としては前章で述べた PLA など様々なものがあるが、中でもゼラチンは、生体適合性に優れており、プラスミド DNA をはじめとした高分子とのコアセルベーションによりゼラチンナノスフェアを容易に形成可能である。また、遺伝子発現を指標として細胞内徐放を評価するにあたり、ゼラチンナノスフェアは、架橋により容易に放出パターンの制御が簡
20 便である上、一般に放出速度が速いと認識されている PLA ナノスフェアよりもさらに薬物放出速度が速いため実験上評価しやすいと考えられる。以上の点から、細胞内徐放を T 7 発現系に応用する最初の段階としてゼラチンナノスフェアは、非常に適していると考えられる。そこで、本実施例では、プラスミド DNA を含有したゼラチンナノスフェアを相分離法により作製し、プラスミド DNA
25 A の安定化作用やプラスミド DNA の放出制御に関する検討を行った。

実験材料

ゼラチン（タイプ A：豚の皮から製造）はシグマ社から入手したものを用了。
2-モルホリノエタンスルホン酸の一水和物（MES）、1-エチル-3（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC、WSC）、Na₂SO

4、グリシンは和光純薬のものを用いた。ペントバルビタールは大日本製薬のものを用いた。その他の試薬は前節までの「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

＜pT7-β-グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアの

5 作製＞

pT7-β-グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを相分離法により作製した。5%ゼラチン溶液100mlと0.2mg pT7-β-グロビンIRES-L-ポリA/ml 45mM Na₂SO₄溶液を1.5mlエッペン中で混合し、57℃の水浴中で10分間インキュベートした。その後、10分間ボルテックスし、35%、55%、66%の蔗糖密度勾配の上層にのせ、19000rpm、20℃、1時間（SW55、Beckman）遠心し、pT7-β-グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアが含まれる55%蔗糖の層を分取し、実験に使用した。

＜ゼラチンナノスフェアの架橋処理＞

15 前述のゼラチンナノスフェアの作製後、55%層を2倍に薄め、MESバッファー溶液（0.2M MES, EDC 0.1又は0.5mg/ml, pH4.5）を1/10量加え、反応させた。30分後、グリシンを0.2Mになるように加え、反応を停止させた。

＜S-9分画の作製＞

20 ウィスター系ラットを1晩絶食させ、ペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔し、心臓採血により脱血死させた。氷冷0.15M KClを門脈より肝臓に還流して肝臓の血液を出来るだけ除いた。肝臓を摘出して氷冷0.15M KClで洗浄し、肝臓の重量の3倍量の氷冷0.15M KClを加え、氷冷下でホモジナイズした。9000g、4℃、10分間遠心し、上清をS-9分画として25 用いた。なお、S-9分画は液体窒素を用いて急速凍結した上で、-80℃で保存した。

＜プラスミドDNAの安定化の検討＞

pT7-β-グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを5% S-9分画溶液に入れ37℃で反応させた。一定時間後、遠心して得たナノス

フェアはトリプシン処理して崩壊させ、エチジウムブロマイドでプラスミドDNAを標識し、アガロース電気泳動によりプラスミドDNAの安定性を評価した。

<ゼラチンナノスフェアからのプラスミドDNAの放出>

- pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを上
- 5 述の方法を用いてそれぞれの濃度で架橋処理し、1.25 mg/mlトリプシン中で一定時間処理した。その後、遠心してナノスフェアを除去し、プラスミドDNAの放出量をDABAを用いて定量した。

実験結果と考察

- 細胞内におけるプラスミドDNAの安定性を評価する目的で、モデルとしてラ
- 10 ット肝ホモジネートのS-9分画を用い、プラスミドDNAの分解性をアガロースゲル電気泳動法により検討した(図2)。プラスミドDNAそのものをS-9分画と作用させた場合、30分以内にほとんど全てのプラスミドDNAが分解しているにもかかわらず、ゼラチンナノスフェアに封入したものでは60分以降においても安定にプラスミドDNAが存在していた。このことにより、ナノスフェア
- 15 アーにプラスミドDNAを封入することによるプラスミドDNAの安定性の向上が示された。また、ゼラチンナノスフェアに種々の濃度にて架橋剤処理を行った後、トリプシン溶液中におけるゼラチンナノスフェアからのプラスミドDNAの放出パターンを検討したところ、架橋剤の処理濃度が高くなるにつれ放出量が抑制されることが示された(図3)。
- 20 核内と比較し、プラスミドDNAが分解されやすい細胞質内において遺伝子発現を行なうT7発現系では、ナノスフェア内に含まれるプラスミドDNAの安定性とナノスフェアからの徐放速度が、遺伝子発現量と遺伝子発現期間の調節に対し鍵を握ることになる。本結果はゼラチンナノスフェアに封入することによりプラスミドDNAの安定性が向上し、また、ナノスフェアの作製条件を変
- 25 化させることにより、薬物(今回の実験においてはプラスミドDNA)の徐放化を自由にコントロール可能であることが示唆され、遺伝子発現量と遺伝子発現期間を調節できる可能性が示された。

[実施例4] 膜融合リボソームを用いたゼラチンナノスフェア封入プラスミドDNAの遺伝子発現

実施例 3 ではナノスフェアに封入することにより細胞内におけるプラスミド DNA の安定性の向上、およびゼラチンナノスフェアを架橋剤にて処理することによりプラスミド DNA の放出量を制御可能であることが示された。そこで実施例 4 では、実施例 3 の結果を踏まえ、T7 発現系の遺伝子発現期間の延長および遺伝子発現量の増強を目指し、T7 プロモーターを有するルシフェラーゼ発現プラスミド DNA である pT7- β -グロビンIRES-L-ポリ A 封入ゼラチンナノスフェアを膜融合リボソームを用いることにより T7 RNA ポリメラーゼ産生細胞に導入し、細胞内徐放に伴う T7 発現系の遺伝子発現パターンへの影響について検討を行なった。

10

実験材料

ルシフェラーゼ分析システム、ピッカジーンは東洋インキのものを用いた。その他の試薬は参考例及び実施例 1～3 までの「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

<膜融合リボソームの作製と精製>

- 15 参考例の「リボソームと膜融合リボソームの作製と精製」を一部改変して作製した。すなわち、あらかじめ紫外線照射 (2000 J/m^2) によりウイルスの RNA 断片化させたセンダイウイルスとリボソームを反応させ、膜融合リボソームを得た。

<培養細胞>

- 20 サル腎上皮細胞 LLC-MK2 #10 細胞は 10% 牛胎児血清 (fetal calf serum; FCS) を含むイーグル MEM 培地で培養した。

<培養細胞への物質導入>

- 5 5×10^4 個の LLC-MK2 #10 細胞を 12 穴プレートに播種した。1 日後、PBS (-) で洗浄後、適当な濃度に血清無添加イーグル MEM 培地で希釈して
- 25 遺伝子量を一定にそろえた pT7- β -グロビンIRES-L-ポリ A 封入膜融合リボソーム、pT7- β -グロビンIRES-L-ポリ A 封入ゼラチンナノスフェア封入膜融合リボソーム、pT7- β -グロビンIRES-L-ポリ A 封入ゼラチンナノスフェアを 1 時間作用させた。PBS (-) で洗浄後、イーグル MEM 培地で培養した。

＜ルシフェラーゼ活性の測定＞

ルシフェラーゼ活性はルシフェラーゼ分析システム及びルミノメーター (L u m i t L B 9507, B e r t h o l d) を用いて測定した。活性は比光ユニット (R L U) / ウェルとして表した。

- 5 そのほかの実験方法については実施例3の「実験方法」に準じて行なった。

実験結果及び考察

- 0.01mg/mlのEDCにて架橋を行なったプラスミドDNA含有ナノスフェアを膜融合リボソームに封入し、T7RNAポリメラーゼ産生細胞に導入後、経日的な遺伝子発現を指標としてナノスフェアの有効性を検討した (図
- 10 4)。遺伝子量をそろえたプラスミドDNAのみを封入した膜融合リボソーム及びプラスミドDNA封入ナノスフェアを同様に細胞に作用させ、経日的なルシフェラーゼ活性を測定した結果、ほとんどルシフェラーゼ活性が得られなかった。一方、プラスミドDNA封入ナノスフェアを封入した膜融合リボソームを用いた群では、遺伝子導入1日後および2日後において非常に高いルシフェラーゼ活
- 15 性が認められた。また、その遺伝子発現効率は、遺伝子導入後1日目と2日目においてほぼ同程度であった。従来、T7発現系における遺伝子発現パターンが遺伝子導入1日後から顕著に遺伝子発現が消失することが判明していることから、ナノスフェアに遺伝子を含有させ細胞質内に導入することにより、若干の遺伝子発現期間延長が認められたと考えられる。今回の条件下では4日目には遺伝子
- 20 発現が減少してしまったが、遺伝子発現効率の上昇と少なくとも2日間の遺伝子の安定化作用は得られた。なお、ナノスフェアの作製条件を変化させることにより遺伝子発現量と遺伝子発現期間を調節可能となることが期待される。

請 求 の 範 囲

1. 生理活性物質を封入したナノスフェアが、膜融合能を有するリボソームで封入されている、細胞質内への生理活性物質導入用徐放性組成物。
- 5 2. ナノスフェアの粒径が10～600 nmである請求項1記載の組成物。
3. 膜融合能がセンダイウィルスに由来するものであることを特徴とする請求項1又は2記載の組成物。
4. 生理活性物質が、低分子量の薬物、蛋白質及び遺伝子からなる群から選択される請求項1、2又は3記載の組成物。
- 10 5. 生理活性物質をナノスフェアに封入し、さらにそのナノスフェアを膜融合能を有するリボソームに封入することからなる、生理活性物質含有、細胞質内徐放化組成物の製造方法。
6. 請求項1～4のいずれかの組成物を生存している細胞に接触させることを特徴とする、動物に生理活性物質を導入する方法。

15

20

25

図 1

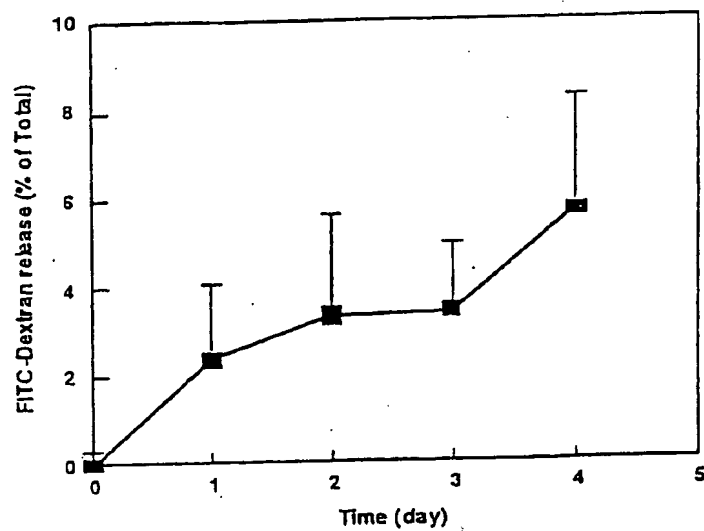


図 2

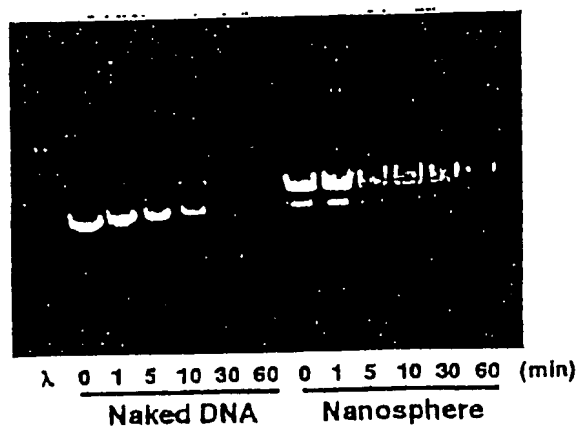


図 3

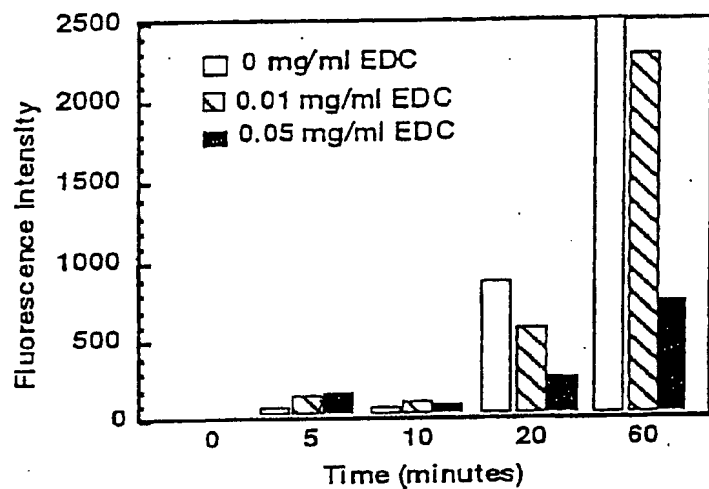
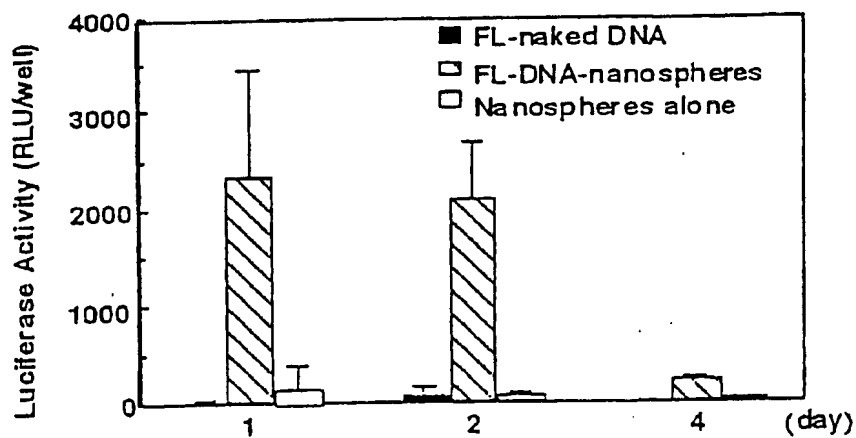


図 4



P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 22 SEP 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-460	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01267	国際出願日 (日.月.年) 03.03.00	優先日 (日.月.年) 03.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K9/52		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 03.03.00	国際予備審査報告を作成した日 07.09.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C 8517
	今村 玲 英 子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 6

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 6 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

治療による人体の処置方法に関するものである。（PCT第34条(4)(a)(i)、PCT規則67.1(iv)）

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☐ 請求の範囲 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査を行うことができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-5	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-5	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-5	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: British Journal of Cancer, vol.73 (1996), H Mizuguchi et al.
"Application of fusogenic liposomes containing fragment A of
diphtheria toxin to cancer therapy" p.472-476

文献2: JP, 11-116499, A (旭化成工業株式会社)
27. 4月. 1999 (27. 04. 99)

文献3: JP, 9-110678, A (田辺製薬株式会社)
28. 4月. 1997 (28. 04. 97)

文献1には、センダイウイルスにより膜融合能を持たせたリポソームに生理活性物質を含有させたものが記載されているが、ナノスフェアを封入することについては記載されていない。

文献2、3には、それぞれ、表面が高分子で被覆されたナノスフェアが記載されているが、ナノスフェアが膜融合能を有するリポソームで封入されることについては記載されていない。

請求項1-5に係る発明は、「生理活性物質を封入したナノスフェアが、膜融合能を有するリポソームで封入されている」ことにより、細胞内へ生理活性物質を直接かつ効率よく導入し、しかも細胞内での放出を制御するという、有利な効果を奏するものであるところ、文献1-3を組み合わせても、上記の構成及び効果は当業者が容易に想到するものであるとは認められない。

ST
Translation

TENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-460	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/01267	International filing date (day/month/year) 03 March 2000 (03.03.00)	Priority date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/52		
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 March 2000 (03.03.00)	Date of completion of this report 07 September 2000 (07.09.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 6

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 6 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claim 6 relates to a method for treatment of the human body by therapy. (PCT Article 17(4)(a)(i), and PCT rule 67.1(iv))

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy(H. Mizuguchi et al.) ,British Journal of Cancer, 1996,Vol. 73 (1996), pages 472-476

Document 2: JP, 11-116499, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 27 April, 1999 (27.04.99)

Document 3: JP, 9-110678, A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 28 April, 1997 (28.04.97)

Document 1 describes a physiologically active substance contained in a liposome, to which the membrane fusion ability of Sendai virus has been imparted, but does not describe that a nanosphere is encapsulated.

Documents 2 and 3 respectively describe a nanosphere whose surface is covered by a polymer, but do not describe that a nanosphere is encapsulated in a liposome having a membrane fusion ability.

The subject matters of claims 1-5 produce advantageous effects of transferring a physiologically active substance into a cell directly and efficiently because "the physiologically active substance is contained in the nanosphere encapsulated in a liposome having a membrane fusion ability," and controlling the release in the cell. It is considered the above-mentioned structure and effects could not have been easily conceived by a person skilled in the art even when documents 1-3 are combined.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月15日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/17511 A1

(51) 国際特許分類: A61K 9/52

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/01267

(22) 国際出願日: 2000年3月3日 (03.03.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/249845 1999年9月3日 (03.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP]; 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地 2 Ibaraki (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 真弓忠範

(MAYUMI, Tadanori) [JP/JP]; 〒655-0041 兵庫県神戸市垂水区神陵台4-1-51-507 Hyogo (JP). 中川晋作 (NAKAGAWA, Shinsaku) [JP/JP]; 〒581-0045 大阪府八尾市西木の本4-4-1-3-101 Osaka (JP). 堤康央 (TSUTSUMI, Yasuo) [JP/JP]; 〒562-0023 大阪府箕面市粟生間谷西4-2-20-503 Osaka (JP). 中西真人 (NAKANISHI, Mahito) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府吹田市山田6-8-301 Osaka (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF INTRACELLULAR SUSTAINED-RELEASE OF DRUG AND PREPARATIONS

(54) 発明の名称: 細胞内薬物徐放化方法及び製剤

(57) Abstract: A transport carrier wherein a target substance to be transferred is contained in a nanosphere and the nanosphere is encapsulated in a membrane fusion liposome. By using this carrier, a physiologically active substance, in particular, one having a high molecular weight such as a protein or a gene can be efficiently transferred into a cell and the release speed of the active substance can be controlled after transferring into the cell. The membrane fusion liposome is prepared by imparting a membrane fusion ability of Sendai virus to a publicly known liposome.

(57) 要約:

目的導入物質をナノスフェア内に含有させ、このナノスフェアを膜融合リポソームに封入することにより、生理活性物質、特に蛋白質、遺伝子のような高分子の生理活性物質を効率良く細胞内へ導入でき、しかも細胞内に導入された後、細胞内での当該活性物質の放出速度を制御できるような運搬キャリアを開発した。膜融合リポソームは、公知のリポソームにセンダイウィルスの膜融合能を付与することによって作製されるものである。

WO 01/17511 A1

明細書

細胞内薬物徐放化方法及び製剤

5 (技術分野)

本発明は、薬物、蛋白、遺伝子等の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための技術に関する。さらに詳細には、目的の生理活性物質を細胞内に直接導入し、細胞内で徐放するための生理活性物質含有組成物及び方法に関する。

10 (背景技術)

近年、遺伝子治療や新規ワクチン療法などを行うために、遺伝子や抗原性蛋白質などの生体高分子物質を細胞質内に直接、効率良く導入する開発が進められている。特に、遺伝子、抗原性蛋白質、生理活性蛋白質等の高分子物質は、低分子の薬物と異なり、膜透過性が悪く、吸収や組織移行性に乏しい上、血中で速やかに分解されてしまう。このような高分子生理活性物質を細胞に傷害を与えることなく自由に効率良く細胞質内に導入する技術の開発が望まれていた。

リポソームは多くの物質を保持することができ、しかも生体適合性であるため、生物活性物質運搬のためのキャリアーとして従来から注目されている。しかしながら、リポソームでは、細胞内への目的物質の導入効率が非常に悪く、ほとんど細胞質内へ導入されない。そのため、リポソーム表面をレクチン、抗体等で修飾して積極的に細胞表面に結合させる方法等、種々の工夫がなされてきた。しかしながら、リポソーム及び表面修飾リポソームは、いずれもエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれるため、ライソゾーム酵素によって分解されてしまい、目的導入物質が実際に細胞質内に移行する割合が著しく低レベルになってしまいうという欠点があった。

このような欠点を克服するため、エンドサイトーシス経路によらず、細胞の細胞膜を通過して細胞質に直接導入できるキャリアーとして、リポソームにセンダイウィルスの膜融合能を付与した膜融合リポソームが開発されたことが報告されている。この膜融合リポソームは、細胞膜への融合を仲介するセンダイウィルス

外被蛋白質とリポソームとの複合体を形成させることによって作製される。この膜融合リポソームは、センダイウィルスとほぼ同等の膜融合活性を有し、遺伝子、蛋白質等の高分子物質を内封することにより、細胞に傷害を与えることなく、効率良く目的物質を細胞質中に直接導入できると報告されている（日本DDS学会誌「DDS」、Vol. 13, No. 1（1998年1月）第21～26頁、同誌第27～33頁）。

このような膜融合リポソームをキャリアーとする方法においても、細胞内での生理活性物質の放出を制御できないため、導入された物質が一時に放出され、その活性（毒性）が持続しないという欠点があった。例えば、細胞質内に遺伝子を導入する場合、細胞質内での遺伝子の分解により発現が持続しない。また、薬理活性を有する蛋白質の場合、その活性が持続せず、投与回数及び投与量を増加させることが必要になる。したがって、生理活性物質を細胞内に直接に効率良く導入し、しかも細胞質内でこれらの物質の放出を制御することにより、細胞内での生理活性を効率的に発揮することが可能になる。このような細胞内導入用でかつ、細胞内で目的導入物質を徐放化できる運搬キャリアーの開発が望まれている。

生理活性物質、特に蛋白質や遺伝子のような高分子物質を効率良く、しかも細胞膜を損傷することなく細胞内に導入でき、しかも細胞内において目的物質の放出プロファイルを制御、調節できる、安全かつ安定な運搬キャリアーを開発が望まれている。

20 （発明の開示）

本発明者等は、薬物の徐放化技術の一環として開発されている、ナノスフェアー（nanosphere）に着目し、このナノスフェアーと膜融合リポソームとを組み合わせることを見出して本発明を完成した。

従来より、生体内における薬物の徐放化を目指した研究が盛んに行われており、多くの技術が提案されている。その1つとして、ナノスフェアーの技術がある。ナノスフェアーは高分子マトリックス等からなり、その内部に多量の薬物又は高分子量の物質を封入できる微粒子である。ナノスフェアー中に封入された薬物の放出速度は、そのナノスフェアー微粒子の大きさ、マトリックス構成高分子の種類、及び高分子の分子内または分子間の架橋度等を適宜選択することにより制御

可能である。しかしながら、ナノスフェアは、単独では細胞内に取り込まれにくく、取り込まれたとしてもエンドサイトーシス経路によるため、ライソゾーム酵素による分解を受けるため、導入効率が極端に悪くなるという欠点がある。

本発明者等は、目的生理活性物質封入ナノスフェアを膜融合リボソームと組み合わせて用いることが出来れば、細胞質内へのナノスフェアが効率良く導入でき、しかもナノスフェア内に封入された目的物質の細胞質内での放出が制御できるのではないかと考え、研究を重ねて本発明を完成した。

本発明は、薬物、蛋白質、遺伝子等の生理活性物質を封入したナノスフェアを、センダイウィルスの膜融合能を付与したリボソームに封入することを特徴としており、細胞内へ生理活性物質を直接かつ効率良く導入し、しかも細胞質内で徐放するための方法及びそのための組成物を提供するものである。

(図面の簡単な説明)

図1は、実施例2で作製したFITC-デキストランを封入したポリ(乳酸)ナノスフェアのFITC-デキストランの経時的放出を示すグラフである。

15 図2は、実施例3で作製したT7プロモーター配列を有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアの、ラット肝ホモジェナイザー分画との反応におけるプラスミドDNAの安定性を示すアガロースゲル電気泳動図である。

図3は、実施例3のゼラチンナノスフェアにおける、ゼラチンの架橋度と封入プラスミドDNAの放出量との関係を示すグラフである。

20 図4は、T4プロモーターを有するプラスミドDNAを封入したゼラチンナノスフェアを、更に封入した本発明の膜融合リボソームの、細胞内における同プラスミドDNAの経時的発現を示すグラフである。

(発明の実施の態様)

本発明で使用できるナノスフェアは、本発明の目的に沿ったものであれば、
25 従来知られた如何なる材料及び方法を用いて作成されたものでも良い。例えば、
Leelarasamee N. et al, J. Microencapsul. 5; 147-57, 1988, Singh M. et al, Pharm. Res. 12; 1796-1800, 1995, Rutledge L.C. et al, J. Am. Mosq. Do
nitrol. Assoc. 12; 39-44, 1996, Li J. K. et al, J. Pharm. Sci. 86; 891-895,
1997, Kofler N. et al, Int. Arch. Allergy. Immunol. 113; 424-432,

1997 等を参照されたい。本発明に使用できるナノスフェアは10 nm~1000 nm、好ましくは20~600 nmの粒径を有するものである。

本発明によれば、目的の生理活性物質を公知の方法でナノスフェア内に封入し、このナノスフェアを更に膜融合リボソーム中に封入した細胞内導入用、細胞質内徐放性組成物を作成する。リボソームはナノスフェアを保持できるものであれば特に限定されることなく用いられ、常法により、例えば逆相蒸発法 (Szoka, F., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 601 559 (1980))、エーテル注入法 (Deamer, D. W., Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 308 250 (1978))、界面活性剤法 (Brunner, J., et al., Biochim. Biophys. Acta, Vol. 455 322 (1976))等が用いられる。

リボソーム構造を形成するための脂質としては、リン脂質、コレステロール類、チッソ脂質等の慣用の脂質を用いることができ、一般的にはリン脂質が好適である。リン脂質としては、各種天然リン脂質及びこれらの水素添加物、及び合成リン脂質が挙げられる。これらを単独又は2種以上の混合物として使用することもできる。さらに、一般に、リボソーム形成用添加剤として知られるコレステロール、ステアリルアミン、アルファートコフェロール等を、リボソーム形成時に添加することもできる。

リボソームは、その構造が巨大な一枚膜リボソーム (GUV)、大きな一枚膜リボソーム (LUV)、多重層リボソーム (MLV)、小さな一枚膜リボソーム (SUV) のいずれであっても良い。その大きさも、GUVでは、1000 nm以上、LUVでは100 nm~1000 nm, MLVでは200~5000 nm, SUVでは100 nm以下の粒径である。本発明の目的には、10 nm~10 μ m程度、更に好ましくは10~1000 nmの粒径が好ましい。

適当な脂質又は混合脂質等のリボソーム形成物質とリボソーム形成用添加剤としてのコレステロール等と共に、テトラヒドロフラン、クロロホルム、エタノール等のような有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて、減圧下に溶媒を留去して容器内面にリボソーム形成物質の膜を得る。例えば、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁に脂質のフィルムを作製する。これにナノスフェア溶液を内水相として添加し、混合する。さらにこのリボソーム溶液をセンダイウ

イルス、不活性化センダイウィルス、センダイウィルスより精製された膜融合促進蛋白質等の膜融合促進物質と反応させ、膜融合リポソームを作製する。センダイウィルスは元々ヒトに対して病原性を持たないが、更にUV照射することにより、ウィルスRNAを断片化することによって安全性を高めることが好ましい。

- 5 また、本発明の膜融合リポソームは、センダイウィルスの膜融合能のみをリポソームに付与するものであり、安全な粒子である。本発明の膜融合リポソームは、例えばバンハム等の方法（Bangham A. D. J. Mol. Biol. 13; 238-252, 1965）により作成できる。

- 本発明の膜融合リポソームに封入できる生理活性物質とは、細胞内に導入されて生理作用を生じる各種薬物；ホルモン、リンホカイン、酵素などの生理活性蛋白質；ワクチンとして作用する抗原性蛋白質；細胞内で発現する遺伝子、プラスミド等の遺伝子、又は発現を誘発又は誘導する特定の遺伝子の発現に関与する遺伝子；さらに遺伝子治療のために導入される各種遺伝子及びアンチセンス等を挙げることができる。本発明の技術は蛋白質、遺伝子などの高分子量生理活性物質に適用するのに適しているが、低分子量の各種薬物に適用して好ましい結果を得ることができる。
- 10
15

- 本発明の膜融合リポソームは、前述のように安全であるばかりでなく、安定性も高く取り扱いも容易である。また、本発明の方法によれば、細胞質内への物質導入のバリアーである細胞膜の機能傷害を引き起こすことなく、効率良く目的物質を細胞質内に導入できる。さらに、導入される活性物質は、ナノスフェアーの特性、例えば、作製材料、粒子サイズ、架橋度等を適宜選択することにより、その細胞質内での放出プロファイルを制御でき、例えば徐放性にするという、本発明の目的を達成できる。さらに、本発明の膜融合リポソームを生存している細胞に接触させることにより、動物に生理活性物質を導入することができる。
- 20

- 25 本発明を以下に示す参考例及び実施例によって更に詳細に説明する。

〔参考例〕 膜融合リポソームによるナノスフェアーの細胞内への導入

実験材料

L- α -ジミリスチル ホスファチジン酸（PA）、卵黄ホスファチジルコリン（PC）、クロロホルムは日本油脂（株）のものを用いた。コレステロール、蔗

糖、P-フェニレンジアミン、カルシウムイオノホアは和光純薬のものを用いた。フルオスフェアー、カルボキシ修飾0.02 μ m黄緑色フルオロエセントとフルオスフェアー（カルボキシ修飾0.02 mm赤色フルオロエセント）（ナノスフェアー）、カルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体はMolecular Probes, Inc. のものを用いた。イーグルMEMはニッスイのものを用いた。

実験方法

<リポソーム、膜融合リポソームの作製及び精製>

リポソームは、前掲のBanghamらの方法を一部変更して作製した。混合脂質（12.72 mg）[PA:PC:Chol=1:4:5（モル比）]をクロロホルムに懸濁し、ロータリーエバポレーターを用いて遠沈管内壁にリピッドフィルムを作製した。これに内水相としてナノスフェアー/BBS（-）液300 μ lを加えボルテックスミキサーにより、リポソームを作製した。このリポソーム溶液をセンダイウイルスと37℃にて2時間振盪させることにより反応させ、膜融合リポソームを作製した。膜融合リポソームの精製は、反応液を6%、20%、30%、40%、50%の蔗糖密度勾配の上に重層し、24000 rpm、4℃、2時間（SW28.1, Beckman）遠心操作により行なった。遠心後、20-30%、30-40%蔗糖溶液の界面に存在する膜融合リポソーム分画を回収しBBS（-）にて洗浄した[20000 rpm、4℃、40分間（SW28.1, Beckman）]。なお、膜融合リポソームはセンダイウイルスのRNAを断片化するため紫外線照射（2000 J/m²）した後、実験に使用した。

<リポソーム、膜融合リポソームのR18による標識>

0.1 mMのR18/エタノール溶液を蛍光量150000（Ex:490 nm, Em:515 nm）にそろえたりポソーム又は膜融合リポソーム溶液に1/100量加え、1時間室温で反応させた。未反応のR18は、25000 rpm、4℃、40分間（SW55, Beckman）の遠心により徐去した。

<培養細胞>

マウス繊維芽細胞Ltk⁻細胞は10%牛胎児血清（FCS）を含むイーグルMEM培地で培養した。

＜培養細胞へのナノスフェアーの導入＞

4 × 10⁴個のL tk⁻細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS (-) で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸濁したナノスフェアー、リポソーム、膜融合リポソーム（蛍光強度100000, Ex: 490 nm, Em: 515 nm）を1分間作用させた。PBS (-) で洗浄後、退色防止剤である0.1% p-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地を加えた。

＜共焦点レーザー顕微鏡での観察＞

共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡はMRC-1024 (BIO-RAD) を用いた。Kr/Ar laserにより励起し、ナノスフェアー（黄緑色フルオロエセント）はEx: 488 nm, Em: 540 nm (540 DF)、R18はEx: 568 nm, Em: 585 nm (585 LP) で観察した。

＜Ca²⁺インディケーターを用いた細胞内導入効率の測定＞

ナノスフェアー（赤色フルオロエセント）に蛍光Ca²⁺インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を20 mMになるように混合し、1時間室温で混合することによりナノスフェアーに吸着させた。作用後、吸着していないカルシウムグリーン-1を透析 (Spectra/Por Membranes MWCO: 12-14000) により除去した後、バッファー置換してリポソーム及び膜融合リポソームを作製した。1日前に6穴プレートに播種した2 × 10⁴個のL tk⁻細胞をPBS (-) で洗浄し、蛍光強度2700 (Ex: 488 nm, Em: 534 nm) でそろえたカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体単独、カルシウムグリーン-1吸着ナノスフェアー、リポソーム、膜融合リポソームを1分間作用させた。作用後、PBS (-) で洗浄し、イーグルMEM培地で1時間培養後、トリプシンで細胞をはがし、蛍光強度を測定した (Ex: 488 nm, Em: 534 nm)。その後、カルシウムイオノホア/DM SO溶液を0.1 mg/mlになるように添加し、Ex: 488 nm, Em: 534 nmで測定した。

実験結果と考察

最初に蛍光ラベル化された直径20 nmのナノスフェアーを用いて、このナノスフェアーがリポソームや膜融合リポソームに封入され得るかどうかを共焦点レ

ーザー顕微鏡を用いて倍率10000倍で検討した。その結果、凝集している像ではあるが、直径20 nmのナノスフェアの蛍光は、透過像写真によりリボソームや膜融合リボソームの観察される位置にのみ認められた。このことからナノスフェアはリボソーム内に封入可能であり、そのリボソームを用いてナノスフェア封入膜融合リボソームをも作製できることが明らかとなった。また、リボソーム又は膜融合リボソームに数個のナノスフェアが封入されていることが確認された。次に、作製したナノスフェア封入膜融合リボソームおよびリボソームをR18で膜標識した後、それぞれの細胞内へのナノスフェア導入能をLtk⁻細胞を用いて検討した。ナノスフェア封入リボソームやナノスフェアのみを単独で作用させた細胞ではほとんど蛍光が認められなかったのに対し、膜融合リボソームを作用させた細胞では細胞内に多量のナノスフェアが導入されているのが観察された。また、膜融合リボソームの膜標識に用いたR18の赤色蛍光の分布はナノスフェアとは異なり細胞内には認められず、細胞膜上にのみ観察された。また、膜融合リボソームを作用させたLtk⁻細胞を細胞の接着面から4 μmごとにずらした断層像を観察したところ、細胞の形に合わせて細胞膜の内側にナノスフェアが確かに存在し、R18の蛍光が細胞膜上にあることが確認できた。

膜融合リボソームの膜融合能が再確認されたと共に、懸濁状態であるナノスフェアをも膜融合リボソームは効率良く細胞質内に導入できることが示唆されたので、次に、本現象をCa²⁺インディケーターであるカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を用いてさらに詳細に検討した。カルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体はそれ自身は蛍光を有しないが、細胞内で内因性のエステラーゼにより加水分解され、Ca²⁺とキレートを形成することで初めて強い蛍光を発する。そこで、この性質を利用し、まずカルシウムグリーン-1アセトキシメチル誘導体を表面に吸着させたナノスフェアを作製し、これを封入した膜融合リボソームを用いて細胞質内への導入を検討した。細胞質内にほとんどカルシウムが存在しない条件下ではどの群においても蛍光はほとんど認められなかった。また、カルシウムイオノホア作用により細胞内カルシウム濃度を上昇させても、ナノスフェア単独やナノスフェア封入リボソームを作用させた細胞では蛍光

は認められなかった。さらに受動的に細胞質内に輸送されるカルシウムグリーン
- 1 アセトキシメチル誘導体自身を作用させた細胞ではわずかに蛍光が認められ
た程度であった。しかし、ナノスフェア-封入膜融合リポソームを作用させた細
胞ではカルシウムグリーン- 1 アセトキシメチル誘導体自身を作用させた細胞の
5 20 倍以上もの強い蛍光が認められ、膜融合リポソームを用いることによりナノ
スフェア-を効率よく積極的に細胞質内へ導入できることが判明した。

以上の結果より、膜融合リポソームを用いることにより直径20 nmのナノス
フェア-は細胞質内へ直接導入され、その導入効率が非常に高いことが判明した。
また、膜融合リポソームを用いることにより、分子だけでなく粒子までも細胞質
10 内に導入できることが判明したことから、細胞内での物質の空間的動態制御はも

〔実施例1〕 膜融合リポソームによるローダミン-PE封入ポリウレア
ナノスフェア-及びFITC-デキストリン封入ポリ（乳酸）
ナノスフェア-の細胞質内導入

参考例において、膜融合リポソームを用いることにより粒子である直径20 n
15 mのナノスフェア-も効率よく細胞質内への導入可能であることが判明した。そ
こで次に、薬物徐放化能を持つナノスフェア-を作製し、細胞質内への導入及び
ナノスフェア-の細胞内での安定性を検討した。将来の細胞質内における薬物徐
放化可能なナノスフェア-モデルとして、脂溶性薬物モデルとしてローダミン-
PEを封入したポリウレアナノスフェア-、水溶液薬物モデルとしてFITC-
20 Dextranを封入したポリ（乳酸）ナノスフェア-（PLAナノスフェア-
ー）を作製した。

この2種類のナノスフェア-を封入した膜融合リポソームを作製し、細胞に作
用させた後、ナノスフェア-が細胞内で安定に存在しているかを共焦点レーザー
顕微鏡で観察した。

25

実験材料

ジアシル ホスファチジルエタノールアミン-N-リサミン ローダミン B
スルフォニル（ローダミン-PE）はAvanti Polar Lipids,
Inc. のものを用いた。ポリビニルアルコール（PVA）、ドリーレンジイソシ
アネート（TDI）、大豆油、ポリ（乳酸）（分子量5000；PLA）、スパン8

0、塩化メチレンは和光純薬のものを用いた。FITC-デキストラン（分子量150000）はシグマのものを用いた。その他の試薬は前節の「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

5 <ローダミン-PE封入ポリウレアナノスフェア（Ph-ポリウレアナノスフェア）の作製>

Ph-ポリウレアナノスフェアは界面重合法により作製した。すなわち、0.5% PVA/H₂O 20 ml を20000 rpmでホモジナイズし、TDI 2.4 g、大豆油2.5 gとローダミン-PE 0.5 mg/500 mlの混合物を、ゆ
10 っくりと加え、3分間ホモジナイズすることで水中油（O/W）型エマルジョンを作製した。0.5% PVA/H₂O 100 ml を10000 rpmでホモジナイズしておき、先程ホモジナイズしておいた混合物をゆっくり加え、さらに10分
間ホモジナイズすることで水中水中油（（O/W）/W）型エマルジョンを作製した。さらに、ナノスフェア表面を強化するため0.5% PVA/H₂O 100 m
15 lを加え20分間、その後7000 rpm、2時間ホモジナイズをすることによりRh-ポリウレアナノスフェアを作製した。ナノスフェアの精製は10%、20%、30%、40%、50%ステップ蔗糖密度勾配上にポリウレアナノスフェアを重層し、24000 rpmで2時間（SW28.1、Beckman）の遠心操作により行なった。30-40%の蔗糖溶液の境界面に存在するRh-
20 ポリウレアナノスフェア分画を回収し、実験に使用した。

<FITC-デキストラン封入PLAナノスフェア（FITC-PLAナノスフェア）の作製>

FITC-PLAナノスフェアは界面沈殿法により作製した。すなわち、PLAの1 gとSpan 80の1 mlをCH₂Cl₂ 30 mlに加え10000 rpm
25 でホモジナイズし、FITC-デキストラン100 mg/mlを5 mlゆっくりと加え1分間ホモジナイズして油中水（W/O）型エマルジョンを作製し、0.5% PVA/H₂O 100 mlにゆっくり加えさらに5分間ホモジナイズすることで水中油中水（（W/O）/W）型エマルジョンを作製した。さらに7000 rpm、1時間ホモジナイズすることによりFITC-PLAナノスフェアを作製

し、上記条件下でステップ蔗糖密度勾配遠心により精製した。0-10%と10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在するFITC-PLAナノスフェア一分画を回収し、実験に使用した。

＜膜融合リボソームの作製及び精製＞

- 5 参考例の「実験方法」の「リボソームと膜融合リボソームの作製及び精製」を
改変して作製した。すなわち、Rh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リボ
ソームの作製において、ナノスフェアの蛍光強度を50000 (Ex: 550
nm, Em: 590 nm) にしてBanghamらの方法によりリボソームを作
製した。その後10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上にリボ
10 ソーム溶液を重層し、24000 rpmで2時間 (SW28.1, Beckman
n) 遠心し、20-30%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収し、リボソ
ームを精製した。これをセンダイウイルスと反応させ、その後反応物を20%、
30%、35%、45%、50%蔗糖密度勾配上に重層し、24000 rpmで
2時間 (SW28.1, Beckman) 遠心し、30-35%及び35-40
15 %蔗糖溶液の境界面に存在する分画を回収することによりRh-ポリウレアナノ
スフェア封入膜融合リボソームを精製した。

- また、FITC-PLAナノスフェア封入膜融合リボソームの作製において、
ナノスフェアの蛍光強度を10000 (Ex: 490 nm, Em: 520 nm)
にしておリボソームを作製し、これをセンダイウイルスと反応させた。その後
20 10%、20%、30%、40%、50%蔗糖密度勾配上に反応物を重層し、2
4000 rpmで2時間 (SW28.1, Beckman) 遠心した。0-10
%、10-20%の蔗糖溶液の境界面に存在する分画から回収したナノスフェア
ーから作製した膜融合リボソームはそれぞれ10-20%、20-30%の蔗糖
溶液の境界面に存在し、この分画を回収することによりFITC-PLAナノス
25 フェア封入膜融合リボソームを作製した。

＜培養細胞へのナノスフェアの導入＞

4×10⁴個のLtk⁻細胞を4穴チャンバースライドに播種した。1日後、PBS (-) で細胞を洗浄し、血清無添加イーグルMEM培地に懸懸したRh-ポリウレアナノスフェアとRh-ポリウレアナノスフェア封入膜融合リボソーム

(蛍光強度10000, Ex: 550 nm, Em: 590 nm)、FITC-PLAナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア封入膜融合リボソーム(蛍光強度700, Ex: 490 nm, Em: 520 nm)を1時間作用させた。PBS(-)で洗浄後、イーグルMEM培地で培養した。1日後、退色防止剤である0.1%P-フェニレンジアミン/イーグルMEM培地で置換し、観察した。

<共焦点レーザー顕微鏡での観察>

参考例の「実験方法」の「共焦点レーザー顕微鏡での観察」に準じて行なった。ローダミン-PEはEx: 568 nm, Em: 585 nm (585 LP)、FITC-デキストランはEx: 488 nm, Em: 540 nm (540 DF)で観察した。

作製したRh-ポリウレアナノスフェアとFITC-PLAナノスフェア及びそれぞれのナノスフェア封入膜融合リボソームを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、それぞれのナノスフェアが確かに作製されたことが判明した。

また、透過像写真において膜融合リボソームが観察される位置にそれぞれのナノスフェアに封入された物質の蛍光が存在することから、ポリウレアナノスフェア、PLAナノスフェアは膜融合リボソームに封入可能であることが観察された。この実施例で作製したナノスフェアは透過像写真により、ポリウレアナノスフェアの場合、粒子径は200 nm前後、PLAナノスフェアでは約500 nmであることが判明した。また、それぞれのナノスフェアは膜融合リボソームに封入されており、膜融合リボソームのサイズに対し比較的大きな粒子であるナノスフェアでも膜融合リボソームに封入可能であることが判明した。さらに、ポリウレアナノスフェアが膜融合リボソームに封入できたことより、これまでのリボソーム作製法では封入効率が低かった疎水性の薬物をも大量に封入した膜融合リボソームを作製できることが判明した。また、これらのナノスフェア封入膜融合リボソームをLtk⁻細胞に作用させて1日後に観察したところ、これらのナノスフェアは細胞内に確かに存在することが観察された。また、膜融合リボソームによりナノスフェアを導入したLtk⁻細胞は1日後においても形態変化は観察されず、表面的な細胞傷害性はないことが判明した。

このことより、膜融合リボソームは100から500 nmのナノスフェアで

も細胞質内に導入可能であり、さらにこれらのナノスフェアーは1日後においても細胞質内に安定に存在することが確認できた。そこで実施例2では、作製したナノスフェアーからの薬物の放出について検討した。

〔実施例2〕FITC-デキストラン封入ポリ（乳酸）ナノスフェアーの

5 徐放化能

実施例1において、作製したナノスフェアーが膜融合リポソームにより細胞質内へ導入可能であり、かつ少なくとも24時間は細胞内で安定に存在することが判明したが、これらのナノスフェアーが薬物放出かつ徐放が出来なければ当然のことながら細胞内における薬物徐放化は望めない。そこで、FITC-デキストランをモデル薬物と見立て、作製したFITC-PLAナノスフェアーからの徐放を検討した。

実験材料

試薬は実施例1の「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

15 <FITC-デキストラン封入PLAナノスフェアーからの薬物徐放の評価>
FITC-PLAナノスフェアーを蛍光強度100000（Ex：490nm, Em：520nm）でBSS（-）に懸濁し、37℃条件下でインキュベートした。0、1、2、3、4日後、10000rpmで遠心してナノスフェアーを除き、上清のFITC-デキストランの量をEx：490nm, Em：520nm
20 で蛍光光度計を用いて測定した。

実験結果と考察

実施例1で用いたFITC-PLAナノスフェアーからのFITC-デキストランの放出を検討したところ、図1に示したように、4日後においてもわずか6%程度の放出率であり、ゆっくりと徐放されていることが判明した。PLAナノ
25 スフェアー又はマイクロスフェアーの薬物放出は3週間から3カ月程度と言われており、3日後の放出率が10数%という報告もあるが、この実施例で作製したPLAナノスフェアーはこれまでの報告に比べると放出がやや遅い。しかし、PLAナノスフェアーからの薬物放出速度は、PLAの分子量や球体サイズを調節することにより制御が可能であることから、ナノスフェアーの作製条件を適宜変

更することにより細胞質内での薬物徐放特性を調節できる。

実施例 1 の結果とこの実施例 2 の結果を考え合わせることで、細胞質内においてナノスフェアからの薬物の徐放化が達成された。

〔実施例 3〕ゼラチンナノスフェアに封入されたプラスミド DNA の

安定化及び徐放化に関する検討

T 7 発現系はバクテリオファージの T 7 RNA ポリメラーゼと T 7 プロモーター配列を有するプラスミド DNA とを同時に細胞質内に存在させることにより効率よい遺伝子発現が可能となるものである。しかしながら、細胞質内におけるプラスミド DNA の安定性が乏しいため、遺伝子が速やかに分解され消失してしまい、遺伝子発現期間が非常に短い。したがって、T 7 発現系により、疾病治療に必要な期間、必要な量の遺伝子発現を行わせるためには、細胞質におけるプラスミド DNA の安定化および徐放化といった細胞質内での遺伝子の動態制御が必要となってくる。その点、ナノスフェアは徐放化製剤として用いられており、さらに参考例、実施例 1、2 において細胞質内へ導入及び徐放化が可能であることが判明している。ナノスフェアの材質としては前章で述べた PLA など様々なものがあるが、中でもゼラチンは、生体適合性に優れており、プラスミド DNA をはじめとした高分子とのコアセルベーションによりゼラチンナノスフェアを容易に形成可能である。また、遺伝子発現を指標として細胞内徐放を評価するにあたり、ゼラチンナノスフェアは、架橋により容易に放出パターンの制御が簡便である上、一般に放出速度が速いと認識されている PLA ナノスフェアよりもさらに薬物放出速度が速いため実験上評価しやすいと考えられる。以上の点から、細胞内徐放を T 7 発現系に応用する最初の段階としてゼラチンナノスフェアは、非常に適していると考えられる。そこで、本実施例では、プラスミド DNA を含有したゼラチンナノスフェアを相分離法により作製し、プラスミド DNA の安定化作用やプラスミド DNA の放出制御に関する検討を行った。

実験材料

ゼラチン（タイプ A：豚の皮から製造）はシグマ社から入手したものを用いた。2-モルホリノエタンスルホン酸の一水和物（MES）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（EDC、WSC）、 Na_2SO_4

4、グリシンは和光純薬のものをを用いた。ペントバルビタールは大日本製薬のものをを用いた。その他の試薬は前節までの「実験材料」に準ずるものをを用いた。

実験方法

5 作製>

pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを相分離法により作製した。5%ゼラチン溶液100mlと0.2mg pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA/ml 45mMNa₂SO₄溶液を1.5mlエッペン中で混合し、57℃の水浴中で10分間インキュベートした。その後、10分間ボルテックスし、35%、55%、66%の蔗糖密度勾配の上層にのせ、19000rpm、20℃、1時間(SW55、Beckman)遠心し、pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアが含まれる55%蔗糖の層を分取し、実験に使用した。

<ゼラチンナノスフェアの架橋処理>

15 前述のゼラチンナノスフェアの作製後、55%層を2倍に薄め、MESバッファー溶液(0.2M MES, EDC 0.1又は0.5mg/ml, pH4.5)を1/10量加え、反応させた。30分後、グリシンを0.2Mになるように加え、反応を停止させた。

<S-9分画の作製>

20 ウィスター系ラットを1晩絶食させ、ペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔し、心臓採血により脱血死させた。氷冷0.15M KClを門脈より肝臓に還流して肝臓の血液を出来るだけ除いた。肝臓を摘出して氷冷0.15M KClで洗浄し、肝臓の重量の3倍量の氷冷0.15M KClを加え、氷冷下でホモジナイズした。9000g、4℃、10分間遠心し、上清をS-9分画として25 用いた。なお、S-9分画は液体窒素を用いて急速凍結した上で、-80℃で保存した。

<プラスミドDNAの安定化の検討>

pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを5% S-9分画溶液に入れ37℃で反応させた。一定時間後、遠心して得たナノス

フェアーはトリプシン処理して崩壊させ、エチジウムブロマイドでプラスミドDNAを標識し、アガロース電気泳動によりプラスミドDNAの安定性を評価した。

＜ゼラチンナノスフェアからのプラスミドDNAの放出＞

pT7- β -グロビンIRES-L-ポリA封入ゼラチンナノスフェアを上
述の方法を用いてそれぞれの濃度で架橋処理し、1.25mg/mlトリプシン
中で一定時間処理した。その後、遠心してナノスフェアを除去し、プラスミド
DNAの放出量をDABAを用いて定量した。

実験結果と考察

- 細胞内におけるプラスミドDNAの安定性を評価する目的で、モデルとしてラ
ット肝ホモジネートのS-9分画を用い、プラスミドDNAの分解性をアガロー
スゲル電気泳動法により検討した（図2）。プラスミドDNAそのものをS-9分
画と作用させた場合、30分以内にほとんど全てのプラスミドDNAが分解して
いるにもかかわらず、ゼラチンナノスフェアに封入したものでは60分以降に
おいても安定にプラスミドDNAが存在していた。このことにより、ナノスフェ
アーにプラスミドDNAを封入することによるプラスミドDNAの安定性の向上
が示された。また、ゼラチンナノスフェアに種々の濃度にて架橋剤処理を行っ
た後、トリプシン溶液中におけるゼラチンナノスフェアからのプラスミドDN
Aの放出パターンを検討したところ、架橋剤の処理濃度が高くなるにつれ放出量
が抑制されることが示された（図3）。
- 核内と比較し、プラスミドDNAが分解されやすい細胞質内において遺伝子発
現を行なうT7発現系では、ナノスフェア内に含まれるプラスミドDNAの安
定性とナノスフェアからの徐放速度が、遺伝子発現量と遺伝子発現期間の調節
に対し鍵を握ることになる。本結果はゼラチンナノスフェアに封入すること
によりプラスミドDNAの安定性が向上し、また、ナノスフェアの作製条件を変
化させることにより、薬物（今回の実験においてはプラスミドDNA）の徐放化
を自由にコントロール可能であることが示唆され、遺伝子発現量と遺伝子発現期
間を調節できる可能性が示された。

〔実施例4〕膜融合リボソームを用いたゼラチンナノスフェア封入プラス
ミドDNAの遺伝子発現

実施例 3 ではナノスフェアに封入することにより細胞内におけるプラスミド DNA の安定性の向上、およびゼラチンナノスフェアを架橋剤にて処理することによりプラスミド DNA の放出量を制御可能であることが示された。そこで実施例 4 では、実施例 3 の結果を踏まえ、T 7 発現系の遺伝子発現期間の延長および遺伝子発現量の増強を目指し、T 7 プロモーターを有するルシフェラーゼ発現プラスミド DNA である p T 7 - β - グロビン I R E S - L - ポリ A 封入ゼラチンナノスフェアを膜融合リポソームを用いることにより T 7 RNA ポリメラーゼ産生細胞に導入し、細胞内徐放に伴う T 7 発現系の遺伝子発現パターンへの影響について検討を行なった。

10

実験材料

ルシフェラーゼ分析システム、ピッカジーンは東洋インキのものを用いた。その他の試薬は参考例及び実施例 1 ~ 3 までの「実験材料」に準ずるものを用いた。

実験方法

<膜融合リポソームの作製と精製>

15 参考例の「リポソームと膜融合リポソームの作製と精製」を一部改変して作製した。すなわち、あらかじめ紫外線照射 (2000 J/m^2) によりウイルスの RNA 断片化させたセンダイウイルスとリポソームを反応させ、膜融合リポソームを得た。

<培養細胞>

20 サル腎上皮細胞 LLC-MK 2 # 10 細胞は 10 % 牛胎児血清 (f e t a l c a l f s e r u m ; F C S) を含むイーグル MEM 培地で培養した。

<培養細胞への物質導入>

5 $\times 10^4$ 個の LLC-MK 2 # 10 細胞を 12 穴プレートに播種した。1 日後、PBS (-) で洗浄後、適当な濃度に血清無添加イーグル MEM 培地で希釈して
25 遺伝子量を一定にそろえた p T 7 - β - グロビン I R E S - L - ポリ A 封入膜融合リポソーム、p T 7 - β - グロビン I R E S - L - ポリ A 封入ゼラチンナノスフェア封入膜融合リポソーム、p T 7 - β - グロビン I R E S - L - ポリ A 封入ゼラチンナノスフェアを 1 時間作用させた。PBS (-) で洗浄後、イーグル MEM 培地で培養した。

＜ルシフェラーゼ活性の測定＞

ルシフェラーゼ活性はルシフェラーゼ分析システム及びルミノメーター (L u m i t L B 9507, B e r t h o l d) を用いて測定した。活性は比光ユニット (R L U) /ウェルとして表した。

- 5 そのほかの実験方法については実施例3の「実験方法」に準じて行なった。

実験結果及び考察

0. 01mg/mlのEDCにて架橋を行なったプラスミドDNA含有ナノスフェアを膜融合リポソームに封入し、T7RNAポリメラーゼ産生細胞に導入後、経日的な遺伝子発現を指標としてナノスフェアの有効性を検討した (図
- 10 4)。遺伝子量をそろえたプラスミドDNAのみを封入した膜融合リポソーム及びプラスミドDNA封入ナノスフェアを同様に細胞に作用させ、経日的なルシフェラーゼ活性を測定した結果、ほとんどルシフェラーゼ活性が得られなかった。一方、プラスミドDNA封入ナノスフェアを封入した膜融合リポソームを用いた群では、遺伝子導入1日後および2日後において非常に高いルシフェラーゼ活
- 15 性が認められた。また、その遺伝子発現効率、遺伝子導入後1日目と2日目においてほぼ同程度であった。従来、T7発現系における遺伝子発現パターンが遺伝子導入1日後から顕著に遺伝子発現が消失することが判明していることから、ナノスフェアに遺伝子を含有させ細胞質内に導入することにより、若干の遺伝子発現期間延長が認められたと考えられる。今回の条件下では4日目には遺伝子
- 20 発現が減少してしまったが、遺伝子発現効率の上昇と少なくとも2日間の遺伝子の安定化作用は得られた。なお、ナノスフェアの作製条件を変化させることにより遺伝子発現量と遺伝子発現期間を調節可能となることが期待される。

請 求 の 範 囲

1. 生理活性物質を封入したナノスフェアが、膜融合能を有するリボソームで封入されている、細胞質内への生理活性物質導入用徐放性組成物。
- 5 2. ナノスフェアの粒径が10～600nmである請求項1記載の組成物。
3. 膜融合能がセンダイウィルスに由来するものであることを特徴とする請求項1又は2記載の組成物。
4. 生理活性物質が、低分子量の薬物、蛋白質及び遺伝子からなる群から選択される請求項1、2又は3記載の組成物。
- 10 5. 生理活性物質をナノスフェアに封入し、さらにそのナノスフェアを膜融合能を有するリボソームに封入することからなる、生理活性物質含有、細胞質内徐放化組成物の製造方法。
6. 請求項1～4のいずれかの組成物を生存している細胞に接触させることを特徴とする、動物に生理活性物質を導入する方法。

15

20

25

図 1

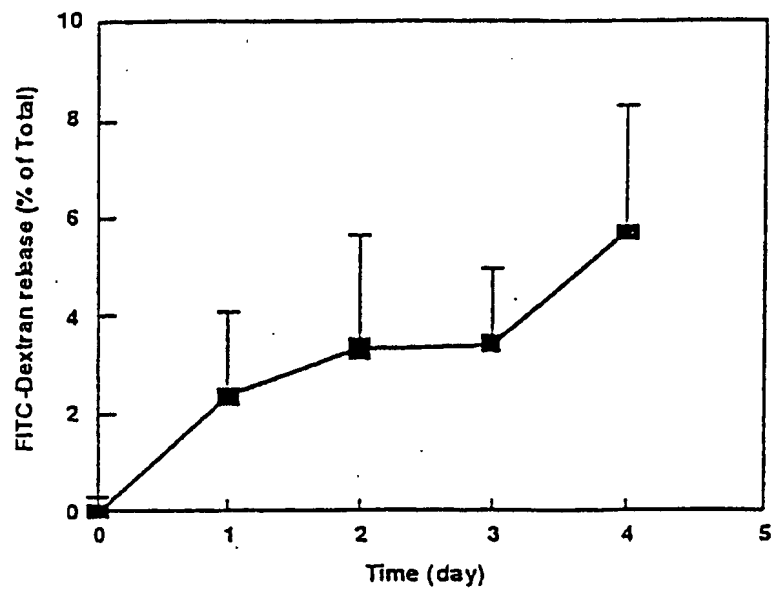


図 2

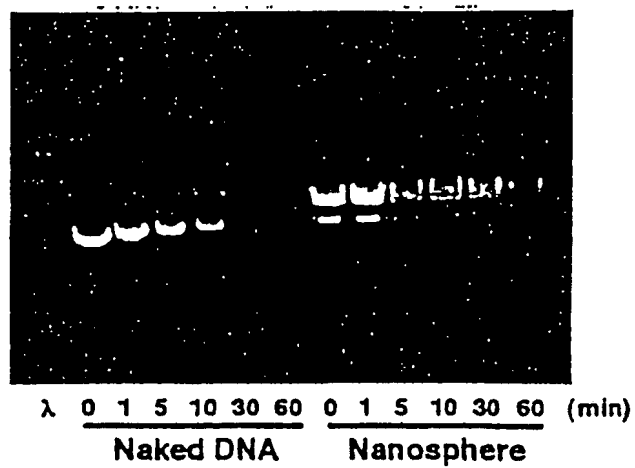


図 3

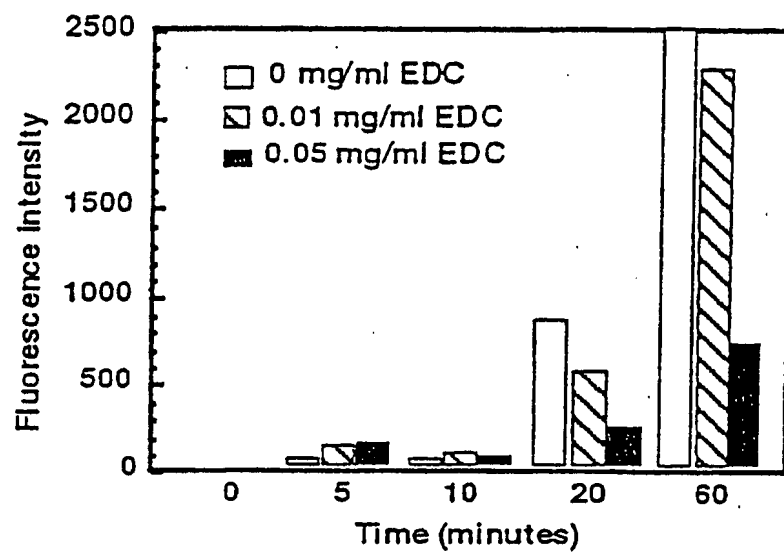
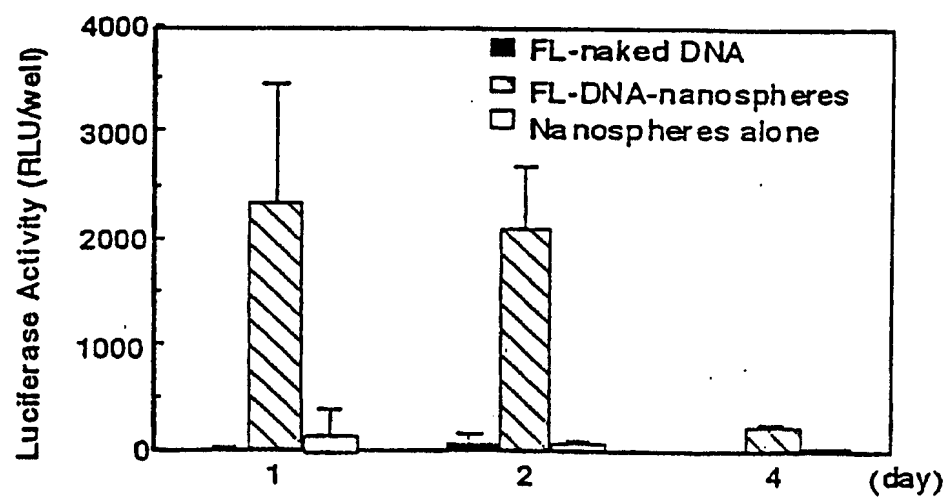


図 4



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K9/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K9/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN) , MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	British Journal of Cancer, vol.73 (1996), H Mizuguchi et al., "Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer thrapy" p.472-476	1-5
A	JP, 11-116499, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 27 April, 1999 (27.04.99) (Family: none)	1-5
A	JP, 9-110678, A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 28 April, 1997 (28.04.97) (Family: none)	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 May, 2000 (23.05.00)Date of mailing of the international search report
06 June, 2000 (06.06.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 6 relates to a method for treatment of the human body by therapy. (PCT Article 17(2)(a)(i), and PCT Rule 39.1(iv))

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/52

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K9/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	British Journal of Cancer, vol.73 (1996), H Mizuguchi et al. "Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy" p.472-476	1-5
A	JP, 11-116499, A (旭化成工業株式会社) 27. 4月. 1999 (27. 04. 99) (ファミリーなし)	1-5
A	JP, 9-110678, A (田辺製薬株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97) (ファミリーなし)	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 05. 00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子 印

4C

8517

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
治療による人体の処置方法に関するものである。
(PCT第17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv))

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。